一种分离提纯眼镜蛇（*Naja naja atra*）神经毒素的简便方法

龚潮梁 余素清 宋世廉
（中国科学院昆明动物研究所）

摘 要

本文报导了一种分离提纯眼镜蛇神经毒素的简便方法：用pH7.8，0.01*M*磷酸盐缓冲液平衡的CM-纤维素柱吸附眼镜蛇毒，经平衡缓冲液洗涤后，以含不同NaCl浓度的平衡缓冲液分段洗脱。眼镜蛇神经毒素在用含0.07*M* NaCl的缓冲液洗脱时被洗脱下来，此组份的洗脱液合并后经70°C选择性热变性处理，冷却后离心除去变性的杂蛋白沉淀，溶液加入三倍体积的冷丙酮，得到含盐的眼镜蛇神经毒素沉淀，用Sephadex G10脱盐后冻干，即可得到纯眼镜蛇神经毒素。

此法分离提纯的眼镜蛇神经毒素，聚丙烯酰胺凝胶电泳显示出单一的区带，Sephadex G-50凝胶过滤层析出现单一的、对称的洗脱峰，与抗眼镜蛇毒血清进行免疫扩散时呈现单一的沉淀线。此神经毒素小鼠腹腔注射的LD_{50}为1.1μg/20g体重，当浓度为1.0mg/ml时，A_{280nm}^{1cm}为1.07。得率约为全毒的6.5%。

眼镜蛇毒的主要毒性成份是多种碱性多肽，因此常用阳离子交换剂CM-纤维素、CM-Sephadex或SE-Sephadex来分离眼镜蛇毒[1～4]Yang等[1]首先从华南眼镜蛇（*Naja naja atra*）蛇毒中提纯了眼镜蛇神经毒素（Cobrotoxin），并得了结晶。其纯化的步骤是把眼镜蛇毒经两次硫酸铵沉淀，取0.65～0.92硫酸铵饱和度的沉淀经Sehadex G-25脱盐、冻干，再用CM-纤维素分离，梯度洗脱，得到一个得率为6％的眼镜蛇神经毒素组份，溶液再经脱盐和冻干得到眼镜蛇神经毒素。此法可靠，但操作较为繁锁，且只能分离眼镜蛇神经毒素。本文提出的方法，系采用较高的pH和离子强度的磷酸盐缓冲液平衡CM-纤维素柱，以减少交换剂对等电点较毒性多肽为低的酶蛋白的吸附；用70°C选择性热变性除去眼镜蛇神经毒素所在的洗脱组份中夹杂的不耐热的酶，并用丙酮直接从溶液中沉淀眼镜蛇神经毒素。此法操作较简便，提纯效果亦好，同时还可以从CM-纤维素柱上继续洗下心脏毒素等其他组份。

材料和方法

1.眼镜蛇毒　取自广西梧州，鲜毒经冻干后制成干粉，储存于冷暗干燥处。干粉对小鼠腹腔注射的LD_{50}为8.7μg/20g体重。

2.*CM*-纤维素　参照上海生化研究所东风生化试剂厂的方法和Meister[5]的方法合成：新华滤纸经粉碎制成80～120目的的纤维素粉，在冰水浴中每500g纤维素粉慢慢加入6000ml 40% NaOH，边加边搅拌，反应温度应维持在10°C左右，并于加完碱液后继续搅拌半小时。移去冰水浴，在搅拌下慢慢加入4.2*M*氯乙酸1500ml，加完后移入60°C水浴中加温搅拌2小时。反应物用细布抽滤，滤液弃去，滤饼用冰水浴冷却，在搅拌下滴加6*N* HCl，中和过量的碱，控制反应在20°C左右。搅拌一小时后抽滤，滤饼用蒸馏水洗涤后浸泡在2500ml 1*N* HCl中，搅拌一小时。抽滤，滤饼用蒸馏水洗至无氯离子为止，再用无水酒精和乙醚依次脱水，最后烘干研细，取80～120目供实验用。依本法所制的CM-纤维素的交换当量可达0.6～0.7毫克当量/克。

3.*Sephadex G*-10、*G*-50　系瑞典Pharmacia厂出品。

4.酶活力测定　按涂光俦等[6]所用的方法进行。

5.LD_{50}按张昌绍、张毅主编的药理学[7]一书中介绍的Karber法进行测定。蛋白浓度按Lowry等[8]的方法测定，用牛血清白蛋白作标准。

6.聚丙烯酰胺凝胶电泳　采用垂直平板式，凝胶板为12×8×0.2cm。浓缩胶浓度为4%，pH4.3；分离胶浓度为10%，pH6.7，交联度均为2.6%。电极缓冲液为pH 4.5的β-丙氨酸-醋酸缓冲液。电泳时电流稳定为15mA，电泳3小时，电泳后50%三氯乙酸固定，染色液为考马斯亮兰溶液（1%考马斯亮兰R250:10%三氯乙酸＝1：19），用7%醋酸溶液脱色。

7.免疫扩散分析　采用pH8.6，0.05*M*巴比妥缓冲液配制的1%琼脂溶液浇板。抗血清为上海生物制品研究所生产的精制马抗眼镜蛇毒血清。

8.眼镜蛇毒的柱层析分离和眼镜蛇神经毒素的纯化　CM-纤维素柱(3.0×65cm)用pH7.8，0.01*M*磷酸盐缓冲液平衡。5g眼镜蛇毒溶于15ml该平衡缓冲液中，离心除去不溶物后上柱。用平衡缓冲液洗涤，洗下不吸附的组份。再依次用含0.04*M*、0.07*M*、0.01*M*、0.15*M*、0.25*M*及0.35*M* NaCl的该平衡缓冲液洗脱，每管收集8ml，每6分钟收集一管。神经毒素在0.07*M* NaCl洗下的组份E中，心脏毒在0.25*M* NaCl洗下的组份G_1与G_2中。若只分离眼镜蛇神经毒素，则在组份E被洗脱下来后，即可停止洗脱进行CM-纤维素的再生处理。

合并组份E的溶液，调pH到6.5，在70°C恒温水浴中保温半小时，进行选择性热变性处理。冷却后离心除去变性蛋白的沉淀，清液冷却到4°C，在搅拌下慢慢加入三倍体积的冷丙酮，即有絮状沉淀析出。4°C静置4小时后过滤，沉淀经干燥后即得含盐量为60%～70%的眼镜蛇神经毒素。用Sephadex G-10脱盐，溶液冻干即得纯化的眼镜蛇神经毒素。

结　果

1.依本法用CM-纤维素柱层析分离眼镜蛇毒，可得到10个组份（图 1）。其中组份A、B为不吸附峰。组份E为眼镜蛇神经毒素，约占总蛋白量的6.5%。组份G_1、G_2为眼镜蛇心脏毒素，二者共占总蛋白量的40%以上。组份C、D和I也显示神经毒活性，组份H也具有心脏毒样活性。组份F为无毒成份。

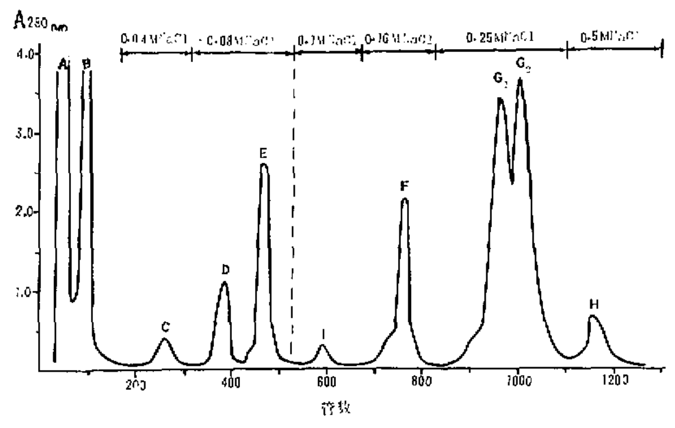


图 1　眼镜蛇毒的CM-纤维素柱层析图谱

5g眼镜蛇毒溶于pH7.8，0.01*M*磷酸缓冲液加入CM-纤维素柱（3.0×65cm），用磷酸缓冲液洗涤后，用含0.04*M* NaCl，0.08*M* NaCl、0.10*M* NaCl、0.15*M* NaCl、0.25*M* NaCl及0.5*M* NaCl的磷酸缓冲液分段洗脱。每小时收10管，每管 8 ml

2.从分离组份的酶活力测定结果表明，磷酸单酯酶、磷酸二酯酶、5′-核苷酸酶、L-氨基酸氧化酶及磷酯酶A的主要活力都在组份A中。组份E也可测到很低的前三种酶的活力，但经过选择性热变性处理后，均随之失活除去。

3.选择性热变性处理后的眼镜蛇神经毒素用Sephadex G-50凝胶过滤层析检定时，只出现单一的蛋白峰。而未经此处理的组份E在凝胶过滤时除眼镜蛇神经毒素峰外，还出现了大分子蛋白峰(图 2)。此结果与选择性热变性前后的酶活力测定结果一致。

4.经过选择性热变性处理、丙酮沉淀、脱盐和冻干的眼镜蛇神经毒素，在聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现单一的区带（图 3），在与抗眼镜蛇毒血清进行的免疫扩散中也出现单一的沉淀线（图 4）。

5.依本法纯化的眼镜蛇神经毒素，对大鼠膈肌膈神经和小鸡颈二腹肌神经标本具有明显的α-型神经毒素的神经肌肉阻断作用（云南省动物研究所第四研究室，1979）。小鼠腹腔注射的LD_{50}为1.1μg/20g。

6.纯化的眼镜蛇神经毒素在浓度为1.0mg/ml时，A^{1cm}_{280nm}为1.07。其红外吸收光谱与Yang[9]的报道相同。

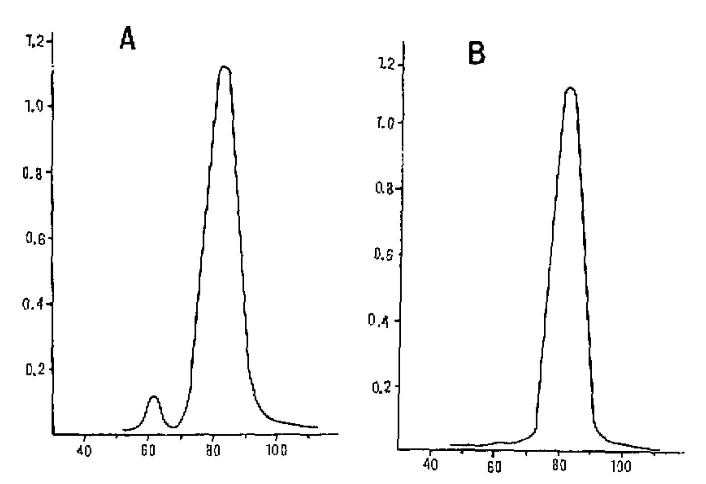


图 2　组份E的Sephadex G-50凝胶过滤层析图

A：选择性热变性处理前的组份E　　B：选择性热变性处理后的组份E

Sephadex G-50柱（1.5×85cm），样品量各为12mg，每小时收5管，每管1.5ml

讨　论

本文报道的用CM-纤维素分离眼镜蛇毒及纯化眼镜蛇神经毒素的方法与其他文献报道不同之处有三：其一是采用pH和盐浓度较高的平衡缓冲液—pH7.8，0.01*M*磷酸盐缓冲液，（一般都是采用pH5.0～6.5的0.005*M*缓冲液。）这既可使眼镜蛇毒中等电点较高的碱性多肽（如神经毒素和心脏毒素等）吸附在交换剂上，又可使许多等电点偏低的组份不吸附而流出，从而改善了碱性毒性多肽的分离。其二是采用选择性热变性的方法清除组份E中夹杂的不耐热的蛋白。由于眼镜蛇神经毒素具有较好的耐热性，在70°C保温半小时，对其活性几无影响。这对于除去组份E中的一些酶活力是行之有效的简便办法，已为酶活力测定和凝胶过滤检定所证明。其三是采用丙酮沉淀，直接从眼镜蛇神经毒素的溶液中得到它的沉淀，而对它的活性并无影响。此法比其他任何浓缩富集的方法（包括硫酸铵分部沉淀在内）都要简捷。丙酮沉淀所得的含盐的眼镜蛇神经毒素用Sephadex *G*-10柱层析脱盐较用Sephadex *G*-25为好。基于以上三点改进，我们分离提纯眼镜蛇神经毒素的操作变得较为简便和快速了。

实验结果表明，用本文报道的方法纯化的眼镜蛇神经毒素其毒性、红外吸收光谱、耐热性、280nm的光吸收、得率、免疫扩散、以及神经肌肉阻断等药理学性质均与Yang[1]报道的Cobrotoxin相一致，用我们改进的方法不难制得纯化的眼镜蛇神经毒素。

依本文所用的方法合成的CM-纤维素性能稳定，分离效果和重复性均比英国Whatman厂生产的CM-纤维素（如CM-11、CM-32）为好。

本文报道的方法不仅适用于实验室制取眼镜蛇神经毒素，也已用在工业上较大量生产纯化的眼镜蛇神经毒素，以便用来制造镇痛新药“克痛宁”。

参 考 文 献

〔1〕 Yang, C.C.; Crystallization and properties of cobrotoxin from Formosan cobra venom. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 1616.
〔2〕 Larsen, P.R. and Wolff, J., The basic proteins of cobra venom. I. Isolation and characterization of cobramines A and B. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 1283.
〔3〕 Karlsson, E. et al, Isolation of the principal neurotoxin of two *Naja naja* subspecies. *Europ. J. Biochem.*, 1971, 21, 1.
〔4〕 Brisbois, L. et al., Etude des fractions obtenus par chromatographie du venin de *Naja naja atra* sur sulpho ethyl sephadex. *J. Chromatog.*, 1968, 37, 463.
〔5〕 Meister, A., *Biochemical Preparation*, 1961, 8, 45, John wiley & Sons Inc., New York, London.
〔6〕 徐光傍等: 我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力测定. 生物化学与生物理学报, 1976, 8, 151.
〔7〕 张昌绍、张毅: 药理学, 1965, 第一卷, 第329页, 人民卫生出版社.
〔8〕 Lowry, O. H. et al, Protein measurment with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
〔9〕 Yang, C.C., Biochemical studies on the toxic nature of snake venom, cobrotoxin from Formasan cobra venom. *Toxins of Animal and Plant Origin*, 1970, p. 206—236, A. de Vries and Kochva (ed.), Gordon and Breach Science Publishers.

A SIMPLE METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF COBRA NEUROTOXIN FROM THE VENOM OF *NAJA NAJA ATRA*

Gong Chao-ling Yu Su-qing Song Shi-lian
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

A simple method for isolation and purification of cobra neurotoxin from the venom of *Naja naja atra* was reported. The cobra venom was absorbed on CM-cellulose pre-equilibrated with pH 7.8, 0.01*M* phosphate buffer. The stepwise elution was carried out with equilibrium buffer containing several concentrations of sodium chloride after washing with equilibrum buffer. Cobra neurotoxin was eluted with equilibrium buffer containing 0.07 NaCl. This pooled fraction was treated with selective heat-denaturation at 70°C. Denatured protein was removed by centrifugation. The cobra neurotoxin was precipitated with 3 volumes of cold acetone from the solution. The purified cobra neurotoxin

was obtained after desalted on Sephadex G-10 and lyophilized.

Cobra neurotoxin purified by above described method showed a single band on electrophoresis in polyacrylamide gel. A symmetrical eluted peak was exhibited by gel filtration on Sephadex G-50. It showed a single precipitate band when the cobra neurotoxin reacted with anti-cobra venom antisera. LD_{50} (i.p.) of the purified cobra neurotoxin was 1.1 μg/20g of mouse. When the concentration of cobra neurotoxin was 1.0 mg/ml, $A^{1cm}_{280nm} = 1.07$. The yield ol the purified cobra neurotoxin was 6.5% approximately.